



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 356 291  
A1

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 89402205.2

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>: C 12 P 7/42  
C 12 P 17/04, C 07 D 315/00

⑭ Date de dépôt: 03.08.89

⑯ Priorité: 04.08.88 IT 6774288

Sacerdote, Giuseppe  
Via S. Pio V. 84  
I-Torino (IT)

⑰ Date de publication de la demande:  
28.02.90 Bulletin 90/09

Barbeni, Massimo  
Via Baretti 19  
I-Torino (IT)

⑯ Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Cabella, Paolo  
Corso Sommelier 17  
I-Torino (IT)

⑰ Demandeur: PERNOD-RICARD  
142, Boulevard Haussmann  
F-75008 Paris (FR)

Squarcia, Francesco  
Via Tagliacozzi 9  
I-Bologna (IT)

⑰ Inventeur: Cardillo, Rosanna  
Via Pietro da Cortona 7  
I-Milano (IT)

⑰ Mandataire: Warcoin, Jacques et al  
Cabinet Réglmeau 26, avenue Kléber  
F-75116 Paris (FR)

Fuganti, Claudio  
Via G.B. Nazari 8  
I-Milano (IT)

⑯ Procédé de production microbiologique de décanolide gamma (R) et d'octanolide gamma (R).

⑰ Le procédé de production microbiologique de décanolide gamma (R) et/ou d'octanolide gamma (R) met en jeu la culture d'un microorganisme sélectionné parmi le groupe comprenant l'Aspergillus niger, le Cladosporium suaveolens, le Phanerochaete chrysosporium et le Pichia etchellsii dans un milieu de culture qui contient une huile végétale, en particulier de l'huile de ricin, de l'huile de tournesol et de l'huile de noix de coco et leurs hydrolysats.

EP 0 356 291 A1

## Description

## PROCEDE DE PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE DE DECANOLIDE GAMMA (R) ET D'OCTANOLIDE GAMMA (R)

La présente invention a trait à un procédé de production par des moyens microbiologiques d'une gammalactone optiquement active, en particulier de la lactone de l'acide hydroxy-4 décanoïque (4R) (gamma-décanolide ou gamma-décalactone) et de la lactone de l'acide hydroxy-4 octanoïque (4R), (gamma-octanolide).

Les lactones citées ci-dessus sont des substances volatiles qui sont très importantes en termes pratiques, car elles sont présentes dans les aliments naturels dont elles constituent une partie de l'arôme.

Il n'est pas économique d'extraire ces composés de sources naturelles parce qu'ils sont en général présents en petites quantités et parce qu'il est difficile de les séparer physiquement des autres composés volatils qui s'y trouvent en même temps.

Le brevet américain US-A-4.560.656 décrit un procédé de production de gamma-décalactone qui exploite la capacité d'espèces des microorganismes des genres Candida, Aspergillus, Geotrichum et Yarrowia de dégrader de façon oxydative l'acide ricinoléique que l'on ajoute à la culture sous cette forme ou sous la forme d'huile de ricin, en présence ou en l'absence d'une lipase externe, pour donner l'acide hydroxy-4 décanoïque (4R) ou la lactone correspondante directement.

Le fait que l'acide gamma-hydroxydécanoïque est un intermédiaire dans la dégradation oxydative de l'acide ricinoléique par des souches appartenant au genre Candida a déjà été étudié par Okui et coll. (J. Biochemistry, 54, 536-540, 1963).

Le brevet américain US-A-4.396.715 décrit un procédé d'obtention d'un arôme comprenant des octalactones, des nonalactones et des décalactones par incubation d'un microorganisme du genre Pityrosporum.

La présente invention a pour object un procédé de production de gamma-décanolide et/ou de gamma-octanolide optiquement actives qui comprend la mise en contact d'une huile végétale, de l'un de ses hydrolysats et/ou d'acide ricinoléique naturel avec une culture en phase de croissance d'un microorganisme sélectionné parmi le groupe comprenant l'Aspergillus niger (CBS 102.12), le Cladosporium suaveolens (CBS 157.58), le Pichia etchellsii (CBS 2011) et le Phanerochaete chrysosporium (CBS 57863).

On préfère utiliser en particulier de l'huile de ricin, de l'huile de tournesol, leurs hydrolysats ou de l'acide ricinoléique pour obtenir du gamma-décanolide.

On préfère utiliser de l'huile de noix de coco en contact avec une culture en phase de croissance de Cladosporium suaveolens pour obtenir du gamma-octanolide.

L'emploi de l'huile de tournesol constitue un avantage économique considérable dans le procédé selon l'invention parce qu'elle est peu coûteuse. Un avantage supplémentaire réside en la possibilité d'utiliser de l'acide ricinoléique naturel qui est suffisamment non toxique envers les microorga-

nismes cités ci-dessus pour ne pas inhiber leur métabolisme. L'emploi d'acide ricinoléique présente des avantages particuliers dans la phase séparation de la lactone désirée, parce qu'il est bien connu qu'elle est particulièrement simple en milieu acide.

La lactone désirée est obtenue à partir des matériaux de départ mentionnés ci-dessus dans des conditions de culture variables et en un temps relativement court, compris entre 24 et 60 heures. De façon typique, on maintient les microorganismes en contact avec les matériaux de départ mentionnés ci-dessus à des températures comprises entre 20 et 30°C inclus.

Le milieu nutritif dans lequel on cultive les microorganismes est du type classique, et, à ce sujet, il faudra se référer aux exemples qui suivent. La culture se déroule sous agitation en ce qui concerne la phase de dégradation au cours de laquelle on obtient la lactone tandis que la production de la biomasse utilisée en tant que préinoculum peut se dérouler avec ou sans agitation, et peut être contrôlée en ce qui concerne la production du composé désiré, par des méthodes techniques standard telles que la CPV (chromatographie en phase vapeur), CCM (chromatographie en couche mince), HPLC (chromatographie liquide sous haute pression), IR (infrarouge) et RMN (résonance magnétique nucléaire). Lorsque l'analyse montre que la production a atteint un maximum, on extrait la lactone désirée. Comme on le sait (voir l'article de I.L. Finar dans Organic Chemistry Vol. I, pages 427-428 par exemple) la forme lactone du composé désiré est sujette à un échange avec l'acide gamma-hydroxy correspondant, et l'extraction de la lactone implique donc la transformation de l'acide gamma-hydroxy en la lactone correspondante.

1) Pour extraire la lactone, on filtre le milieu de culture sur de la Céelite (R), on lave à l'acétate d'éthyle et on extrait la phase aqueuse, de pH acide, de préférence de pH 5, de préférence deux fois à l'aide d'acétate d'éthyle. On extrait les phases organiques combinées deux fois à l'aide d'une solution de carbonate de potassium à 5 pour cent pour éliminer les portions acides. On évapore ensuite la phase organique, séchée sur sulfate de sodium, et on distille le résidu à 150°C et sous 1-3 mm de Hg pour obtenir le gamma-décanolide ou le gamma-octanolide.

2) Pour améliorer le rendement en lactone, on peut lactoniser l'acide  $\gamma$ -hydroxydécanoïque dans le milieu en amenant le pH entre 1 et 5, de préférence entre 1 et 3, par addition d'un acide approprié et en chauffant le milieu acidifié à une température comprise entre 50°C et 110°C, de préférence comprise entre 90 et 100°C, pendant une période comprise entre environ 10 minutes et 2 heures selon la température. On peut séparer la lactone du milieu par entraînement à la vapeur d'eau à partir du milieu acidifié.

Dans les exemples qui suivent, la quantité de lactone obtenue est exprimée en pourcentage

tel qu'il a été obtenu par analyse par chromatographie en phase vapeur (CPV).

Exemple 1

On inocule une suspension d'*"Aspergillus niger"* (CBS 102.12) dans un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant une solution de nutrient de Merck à 2%, de Tween 80 à 0,02% et de 5 g d'acide ricinoléique de pH 7, qui a été stérilisée dans un autoclave pendant 10 minutes à 120°C; ceci est maintenu à 27-30°C pendant une période comprise entre deux et cinq jours et on agite tout le temps. On préleve des échantillons pendant cette période, et on détermine par chromatographie en phase vapeur (CPV) le gamma-décanolide dans l'extrait organique qui est obtenu en agitant l'échantillon avec de l'éther éthylique. On trouve une teneur en gamma-décanolide comprise entre 4 et 12%.

Exemple 2

On répète la procédure de l'exemple 1 mais avec du *Cladosporium suaveolens* (CBS 157.58). On trouve une teneur en gamma-décanolide comprise entre 4 et 10%.

Exemples 3 et 4

On répète les procédures des exemples 1 et 2 mais on utilise 6 g d'huile de ricin au lieu d'acide ricinoléique. On obtient approximativement 5% de gamma-décanolide dans les deux cas après quatre jours d'incubation.

Exemple 5: procédé de séparation

On suit les procédures décrites dans les exemples 1 et 2 avec 5 flacons Erlenmeyer, en utilisant en tout 25 g d'acide ricinoléique; après 48 heures, on filtre les cultures sur de la Célite et on lave la Célite à l'aide d'acétate d'éthyle.

On extrait deux fois la phase aqueuse de pH 5 à l'aide d'acétate d'éthyle. Les phases organiques d'extraction et de lavage de la Célite (220 ml) sont extraites deux fois à l'aide de 150 ml d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 5%. On séche la phase organique sur du sulfate de sodium et on évapore à sec. Une chromatographie en couche mince (CCM) indique la présence de gamma-décanolide et de nombreux autres produits mobiles (éluant: 7 parties d'hexane, 3 parties, d'acétate d'éthyle). Cette substance est distillée dans un ballon à fond rond pour donner environ 350 mg de gamma décanolide, 99.5% en chromatographie en phase vapeur (CPV) où [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +49 (c 1, méthanol).

Exemple 6

On inocule le contenu d'une éprouvette de *Cladosporium suaveolens*, cultivé sur MPGA (20 g/l d'extrait de malt, 5 g/l de peptone, 20 g/l de glucose, 15 g/l de gélose) à 24°C pendant sept jours, dans un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml de MPGB (20 g/l d'extrait de malt, 5 g/l de peptone, 20 g/l de glucose, et complété avec de l'eau). On place le flacon dans une enceinte contrôlée thermostatique-

ment à 30°C et on maintient sous agitation pendant deux jours.

On se sert de ce préinoculum pour enserrer des flacons de 300 ml contenant 50 ml de MPGB, en mettant 5 ml dans chaque flacon.

On cultive ces flacons pendant quatre jours à 30°C sans agitation, point auquel on remplace le milieu par 100 ml d'extrait de viande (20 g/l), 5 g d'acide ricinoléique et 0,2% de Tween et on agite à 30°C.

On surveille la production de gamma-décanolide au moyen d'extractions successives à la suite de deux, trois, quatre, cinq et sept jours.

Extraction à la suite de quatre jours: poids de l'extrait brut: 3 g, analyse par chromatographie en phase vapeur (CPV): 20% de gamma-décanolide, gamma-décanolide isolé par distillation: 0,5 g.

Extraction à la suite de cinq jours: poids de l'extrait brut: 3 g, chromatographie en phase vapeur (CPV): 17%

Extraction à la suite de sept jours: poids de l'extrait brut: 3 g, chromatographie en phase vapeur (CPV): 17%.

Exemple 7

On inocule du *Cladosporium suaveolens* prélevé d'une éprouvette de MPGA cultivé pendant deux jours, dans un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de milieu préparé à l'aide d'extrait de viande (5 g/l) et de 0,2% de Tween. On le laisse à cultiver pendant deux jours à 30°C sous agitation.

A ce point, on ajoute 1 ml d'acide ricinoléique, ce qui amène le pH à 6,5. On agite le mélange à 30°C pendant 18 jours. On obtient 1,1 g d'extrait brut, qui se révèle comme contenant 40% de gamma-décanolide, à partir de quatre flacons (ce qui équivaut à 5 g d'acide ricinoléique).

Exemple 8

On ajoute un inoculum de *Cladosporium suaveolens* prélevé d'une éprouvette dans un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant un milieu comprenant de l'extrait de viande (5 g/l) et 0,2% de Tween et 1 g d'acide ricinoléique (stérilisés tous ensemble). A la suite de neuf jours sous agitation à 30°C, le pH est devenu égal à 6,5. On extrait le contenu des deux flacons (correspondant à 2 g d'acide ricinoléique) et l'on obtient 0,33 g d'extrait brut contenant 62% de gamma-décanolide.

Exemple 9

On répète la procédure de l'exemple 6 jusqu'au point auquel on remplace le milieu à l'aide de 100 ml d'extrait de viande. A ce point, on ajoute 5 g d'huile de tournesol et 0,2% de Tween au lieu de l'acide ricinoléique. On agite le mélange et puis on l'extrait à la suite de 15 jours: extrait brut: 2,6 g; % de lactone: 31% en chromatographie en phase vapeur (CPV) (38% après une lactonisation). On distille cette substance à 150°C et sous 2 mm Hg pour

obtenir 0,350 g de gamma-décanolide pur.

Exemple 10

On ensemence un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif (20 g/l), 0,2 g de Tween et 5 g d'acide ricinoléique à l'aide d'une préinoculum de *Pichia etchellsii* cultivé sur du GYP (50 g/l de glucose, 10 g/l de levure, 10 g/l de peptone) pendant 24 heures. Ce préinoculum dans le flacon avait été inoculé à partir d'une éprouvette sur du MPGA. On avait laissé cultiver le contenu de l'éprouvette pendant deux jours à 24°C. Le pH est de 6.

On cultive le mélange à 30°C sous agitation; à la suite de six jours on extrait deux flacons (correspondant à 10 g d'acide ricinoléique). L'extrait brut pèse 7 g et contient 3,80% de gamma-décanolide.

A la suite de sept jours, on extrait deux flacons, correspondant à 10 g d'acide ricinoléique, pour obtenir un extrait brut que l'on distille dans un ballon à fond rond. On obtient 0,18 g de gamma-décanolide.

A la suite de neuf jours, on extrait quatre flacons, correspondant à 20 g d'acide ricinoléique. L'extrait brut pèse 4,4 g. On distille 2,2 g de cette substance dans un ballon à fond rond pour obtenir 0,1 g de gamma-décanolide (43%) tandis qu'avant la distillation, l'extrait brut contenait 4,40% de gamma-décanolide.

On extrait quatre flacons à la suite de 15 jours. L'extrait brut est repris par de l'hexane et extrait ensuite à l'aide de méthanol/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 50% 1:1. La phase hexanique est concentrée pour obtenir environ un gramme de substance contenant 12% de lactone.

Exemple 11

On inocule un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de milieu à base d'extrait de viande (20 g/l), 0,2 g de Tween et 2 g d'acide ricinoléique (stérilisés tous ensemble) à l'aide de *Pichia etchellsii* 5.10<sup>8</sup> cellules/ml provenant d'une préculture (exemple 10).

A la suite de cinq jours sous agitation à 30°C, on acidifie un flacon correspondant à 2 g d'acide ricinoléique à pH 3 et on le chauffe à 100°C. On continue la distillation pendant 2 heures et on extrait le condensat aqueux à l'aide d'hexane pour donner 0,2 g de γ-décanolide (R).

Exemple 12

On inocule un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de milieu comprenant de l'extrait de viande (5 g/l), 0,20% de Tween et 1 g d'acide ricinoléique (stérilisés tous ensemble) à l'aide de *Pichia etchellsii* directement à partir d'une éprouvette.

On extrait deux flacons correspondant à 2 g d'acide ricinoléique à la suite de deux jours. L'extrait brut pèse 0,32 g et contient 23% de gamma-décalactone.

On extrait deux flacons supplémentaires à la suite de cinq jours. Extrait brut 0,36 g, 5,30% de

gamma-décanolide.

Exemple 13

On inocule un flacon Erlenmeyer de 300 ml contenant 100 ml de milieu comprenant de l'extrait de viande (5 g/l), 0,20% de Tween et 1 g d'huile de noix de coco (dont on a prouvé qu'elle était dépourvue de gamma-octanolide) à l'aide de *Cladosporium suaveolens* directement à partir d'une éprouvette. On effectue l'extraction à la suite de cinq jours et on obtient environ 100 mg de gamma-octanolide.

**Revendications**

1. Procédé de production d'une gamma-lactone optiquement active sélectionnée parmi la gamma-décalactone et la gamma-octalactone qui comprend la mise en contact d'une huile végétale, de l'un de ses hydrolysats ou d'acide ricinoléique avec une culture en phase de croissance d'un microorganisme sélectionné parmi le groupe comprenant l'*Aspergillus niger*, le *Cladosporium suaveolens*, le *Phanerochaete crysosporium* et le *Pichia etchellsii*.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'huile végétale est choisie parmi l'huile de ricin, l'huile de tournesol et l'huile de noix de coco.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on se sert de *Cladosporium suaveolens* et d'huile de noix de coco pour obtenir du gamma-octanolide.

4. Procédé selon la revendication 1 et la revendication 2 dans lequel l'huile végétale est hydrolysée par voie enzymatique à la lipase.

5. Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'acide γ-hydroxydécanoïque est lactonisé par l'action de la chaleur à pH acide.

6. Procédé selon la revendication 1 et 5 dans lequel la γ-décalactone (R) est séparée par entraînement à la vapeur d'eau à partir du milieu acidifié.



## Office européen des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

**Numero de la demande**

EP 89 40 2205

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)		
Y	EP-A-0 258 993 (UNILEVER) * Claims * ---	1	C 12 P 7/42 C 12 P 17/04		
Y	WO-A-8 301 072 (FRITZSCHE DODGE) * Claims * & US-A-4 560 656 (Cat. D) * ---	1			
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 9, no. 241 (C-306)[1964], 27th septembre 1985; & JP-A-60 100 508 (KANEBO K.K.) 04-06-1985 * Abstract * ---	1			
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 9, no. 196 (C-297)[1919], 13th août 1985; & JP-A-60 66 991 (KANEBO K.K.) 17-04-1985 * Abstract * -----	1			
DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHÉ (Int. Cl.5)					
C 12 P					
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications					
Lien de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur			
LA HAYE	21-11-1989	DELANGHE L.L.M.			
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS					
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention				
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date				
A : arrière-plan technologique	D : cité dans la demande				
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons				
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant				

Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications

REF ID: FORM 1103 03.82 (PRO021)

— 5 —

**Date d'achèvement de la recherche**

### **Examination**

**CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES**

X : particulièrement pertinent à lui seul  
 Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
 A : arrière-plan technologique  
 O : divulgation non-écrite  
 P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
.....  
& : membre de la même famille, document correspondant

**BEST AVAILABLE COPY**